

УДК 579.61:579.864.1

ИЗУЧЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

А.К. Туякова, Э. Нагызбеккызы, Г.К. Абитаева, С.С. Даулбай, Г.Н. Ахметова,
С.С. Ануарбекова, К.Х. Алмагамбетов

Республиканская коллекция микроорганизмов, г. Астана
rkm_zavlab@list.ru

Отображены данные по изучению биологических свойств 84 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из различных экологических ниш. Собранная коллекция представлена 7 видами лактобацилл: *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueskii*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*, *Lb. brevis*, *Lb. casei* и 2 видами лактококков: *L. lactis* и *L. piscium*. Определена способность штаммов ферментировать углеводы в микробиологических тестах. Полученные результаты позволили отобрать активные штаммы, обладающие высоким пробиотическим потенциалом. Эти культуры молочнокислых бактерий характеризуются высокой степенью антагонистической активности к ряду условно-патогенных микроорганизмов. Для них характерна устойчивость к таким антибиотикам как канамицин, ванкомицин, стрептомицин и тетрациклин. Характеризуются устойчивостью к секретам желудочно-кишечного тракта. Устойчивость к желчи характеризуется показателем жизнеспособности 10^5 - 10^6 КОЕ/мл, устойчивость к последовательному действию кислоты и желчи -10^7 - 10^8 КОЕ/мл, устойчивость к солям - 10^7 - 10^8 КОЕ/мл. Также пробиотически активные культуры обладают протеолитической, антиоксидантной, лизоцимной и антилизоцимной активностью.

Полученные данные экспериментов, позволили отобрать активные штаммы в качестве стартерных культур для создания биопрепаратов.

Ключевые слова: лактобациллы, пробиотики, антагонизм, устойчивость к антибиотикам, пробиотические свойства.

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня на рынке много различных препаратов, которые рекламируются как пробиотики. Они отличаются между собой своим составом, фармакологическим действием, показаниями к применению. Среди них есть препараты, которые не соответствуют классическим требованиям к пробиотикам. Эффективность пробиотических препаратов в первую очередь зависит от свойств, входящих в их состав видов штаммов бактерий.

К числу пробиотиков, главным образом, относятся представители рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также отдельные штаммы некоторых видов *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* и *Saccharomyces* [1].

В микробиологии одним из важных и перспективных направлений является поиск новых штаммов лактобактерий для конструирования биопрепаратов. В основном для производства пробиотических препаратов используют молочнокислые бактерии. Поэтому актуальной задачей является изучение биологических свойств новых штаммов данных микроорганизмов.

Целью настоящей работы являлось выделение, скрининг и идентификация лактобактерий из кисломолочных продуктов, грудного молока с последующим изучением наиболее важных биологических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В экспериментах использовались 84 штамма молочнокислых бактерий, выделенных из кисломолочных продуктов и из грудного молока кормящих женщин.

Видовую идентификацию лактобацилл проводили согласно общепринятым в бактериологической практике методам и определителю Берги [2]. Изучали сбраживание 16 углеводов: трегалоза, раффиноза, галактоза, рамноза, маннит, фруктоза, арабиноза, ксилоза, мальтоза, манноза, мелибиоза, салицин, сахароза, лактоза, глюкоза, целлобиоза.

Оценку жизнеспособности бактерий определяли по методу Miles&Misra с разведением и высевом на твердые питательные среды [3].

Антагонистическую активность опытных культур к индикаторным тест-штаммам определяли методом отсроченного антагонизма [4]. Тест-штаммы были получены из Центрального музея Республиканской коллекции микроорганизмов.

Для оценки протеолитической активности [5] использовали молочный агар Эйкмана.

Антиоксидантную активность изучали методом определения железо-восстанавливающего FRAP потенциала [6].

Лизоцимную активность определяли по методу J. Hawiger [7].

Антилизоцимную активность изучали методом отсроченного антагонизма по О.В. Бухарину [7].

Оценку чувствительности выделенных культур к антибиотикам определяли методом стандартных дисков в соответствии с методическими указаниями [8].

Устойчивость к секретам макроорганизма, имитирующим транзит по желудочно-кишечному тракту, исследовалась с использованием бычьей желчи, NaCl и изменением pH [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из молочных продуктов домашнего и заводского приготовления, грудного молока кормящих женщин были отобраны 84 изолята молочнокислых бактерий. В соответствии с физиологическими и биохимическими анализами собранная коллекция представлена 7 видами лактобацилл: *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueskii*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* и 2 видами лактококков: *L. lactis* и *L. piscium*.

Далее работа была направлена на изучение пробиотических свойств и отбор наиболее активных микроорганизмов, перспективных для создания бактериальных препаратов.

В качестве контроля использовались 17 музейных штаммов лактобацилл с максимальным показателем жизнеспособности более 10^7 - 10^8 .

Одним из основных пробиотических показателей является антагонизм.

В качестве тест-штаммов использовали: *E. coli* 157 B-RKM 0040, *Serr. marcescens* 221F B-RKM 0059, *P. vulgaris* 177 B-RKM 0038, *S. aureus* 209P B-RKM 0057, *C. albicans* ATCC-885-653 Y-RKM 0475, *Salm. typhimurium* TA98 B-RKM 0162 и клинический изолят *Str. pyogenes*.

Результаты по изучению антагонистической активности показали, что большинство исследуемых лактобактерий обладают ингибирующим действием в отношении всех индикаторных культур, кроме *C. albicans*. Лишь 3 культуры обладают высокой степенью активности к данной культуре. Культуры R1, R2, R3, R4 показали нулевую степень, то есть не обладают антагонистической активностью. Проявление антагонистической активности одной из выделенных культур представлено на рисунке 1.

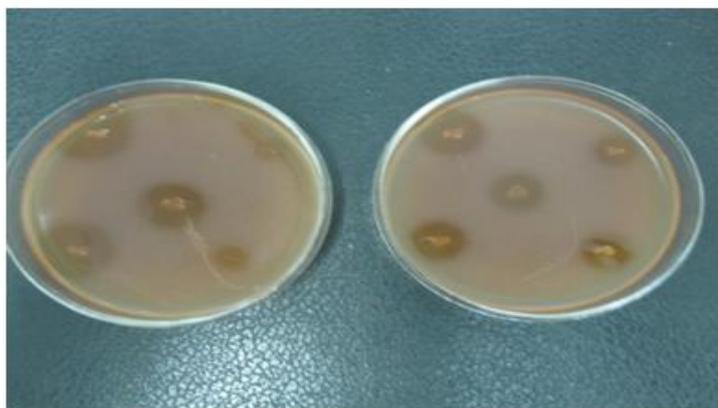


Рис. 1. Антагонистическая активность *Lb. plantarum* 3 к *Serratia marcescens* и *Staphylococcus aureus*

Выделенные культуры способны угнетать патогенную микрофлору. Так, 88% лактобактерий ингибируют *E. coli* ($p < 0,002$), 83% подавляют рост *S. typhimurium* ($p < 0,001$). В отношении *C. albicans* ($p < 0,001$) только шесть штаммов проявили среднюю и высокую степень активности.

В таблице 1 отображены данные антагонистически активных, а также неактивных культур в отношении исследуемых тест-штаммов.

Таблица 1. Антагонистическая активность культур молочнокислых бактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Тест - штаммы	Неактивные штаммы	Количество активных штаммов/ степень ингибирования		
		высокая	средняя	низкая
<i>E. coli</i>	6	74*	3**	1
<i>Serr. marcescens</i>	9	68*	3	4
<i>P. vulgaris</i>	14	64*	5	1
<i>S. aureus</i>	7	64	10	3
<i>C. albicans</i>	75	3	3	3
<i>S. typhimurium</i>	7	70*	6**	1
<i>S. pyogenes</i>	13	34	35	2
* - $p < 0,001$; ** - $p < 0,05$				

В отношении коллекционных штаммов, составляющих контрольную группу, антагонистическое действие проявлялось к большинству тест-штаммов.

Таким образом, основная масса культур лактобацилл обладает антагонистической активностью к ряду патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Одной из важных областей исследования является определение способности микроорганизмов выживать в желудочно-кишечном тракте после прохождения через пищевод. Известно, что лактобактерии относятся к грамположительным бактериям, а они, как правило, менее устойчивы к действию желчных кислот, чем грамотрицательные [10].

Для того чтобы оценить выживаемость клеток бактерий в агрессивных условиях, все исследуемые штаммы подвергали действию кислоты и желчи. Культуры вначале инкубируют при pH 2,0-3,0 в физиологическом растворе в течение 1-2 ч., затем помещают в 1% желчный бульон. Установлена способность лактобактерий выживать в кислых условиях, лишь 5 культур лактобацилл оказались нежизнеспособными. Титр жизнеспособных культур после 24 ч. инкубации составлял 10^7 - 10^8 КОЕ/мл.

Минимальные ингибирующие концентрации желчи определяют в пробирках с питательным бульоном, содержащим бычью желчь (20, 30, 40% объемного веса). Считывание осуществлялось через 24 и 48 ч. инкубации при температуре 37°C. Полученные результаты по изучению устойчивости опытных культур к желчи показали, что 50 штаммов оказались устойчивы к желчи с процентным содержанием 20 и 32 штамма устойчивы к 30% желчи. Выявлены 7 культур, которые остались жизнеспособными в среде с процентным содержанием желчи 40 - *Lb. casei subsp. tolerans* 8, *Lb. salivarius* 4, *Lb. salivarius* 5, *Lb. salivarius* 4, *Lb. salivarius* 5, *Lb. helveticus* 1, *Lb. casei subsp. casei* 2.

Способность исследуемых бактерий к росту при различных концентрациях хлорида натрия определяли при посеве на питательном бульоне с различным содержанием NaCl (2, 4 и 6%). После 48 ч. инкубирования отмечали характер роста исследуемых культур и их количество. Основное число культур остаются жизнеспособными в присутствии 2 и 4% соли, за исключением 11 культур лактобацилл. 35 штаммов оказались активными в присутствии 6% натрия хлорида, титр клеток лактобактерий составил 10^3 - 10^5 КОЕ/мл.

Известно, что при использовании пробиотиков немаловажную роль играет их резистентность к антибиотикам. В нашей работе по определению устойчивости изучаемых культур к антибиотикам были взяты 8 антибактериальных препаратов, которые относятся к различным группам: пенициллины, аминогликозиды, макролиды. Используемые препараты применяются в клинической практике для лечения различных кишечных, легочных инфекций, заболеваний мочевыводящих путей и др.

Полученные результаты показали устойчивость лактобактерий к 4 антибиотикам. Так, к канамицину устойчивы 86,9%; 90,4% – к ванкомицину; к стрептомицину – 17,9% культур и 17,9% – к тетрациклину.

Основная масса молочнокислых бактерий устойчива к 4 антибиотикам, при выборе среди активных штаммов упор будет делаться на 15 культур, обладающих устойчивостью к большему количеству антибиотиков. Среди них преобладают виды *Lb. plantarum* и *Lb. casei*.

Далее исследуемые культуры были протестированы на лизоцимную и антилизозимную активность. Антилизозимная активность является одним из значимых персистентных свойств бактерий, которая позволяет им длительно существовать в макроорганизме.

Выявлено, большая часть бактерий обладает антилизозимной активностью, что составляет 72,6%. Устойчивость к лизоциму проявили 37 культур – 44%. Из коллекционных культур лактобацилл все 17 штаммов обладают данными факторами.

Молочнокислые бактерии для своей жизнедеятельности нуждаются в аминокислотах и в качестве источника аминокислот используют казеины молока. Использование протеолитических активных штаммов молочнокислых бактерий позволит снизить аллергенность молочных белков и разработать новые ферментированные молочные продукты, содержащие биологически активные пептиды [11, 12]. В ходе работ

по изучению протеолитической активности установлено, что изучаемые штаммы имеют максимальную протеолитическую активность. На рисунке 2 показан протеолиз культур лактобацилл. Зона гидролиза наших культур составляла от 1 до 15 мм.

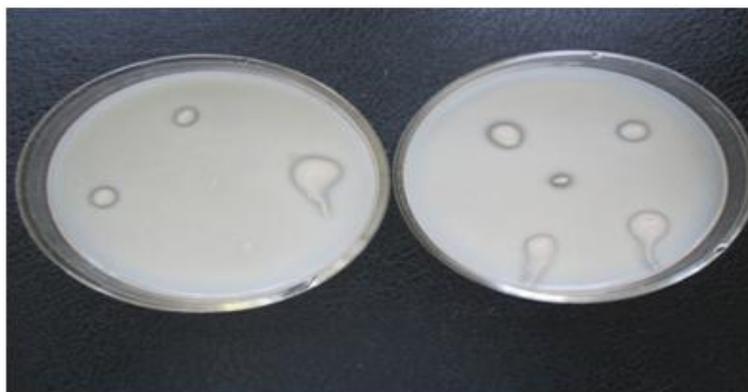


Рис. 2. Протеолитическая активность лактобацилл

Среди музейных 17 штаммов 1 штамм не обладает свойством лизировать казеин, 10 штаммов имеют низкую протеолитическую активность (1-4 мм); 2 – среднюю (5-9 мм); 5 – высокую (10 и более). *L. plantarum* 0015 имеет наиболее высокий показатель протеолиза, который составляет 30 мм.

Из 84 исследуемых культур лишь 8 не обладают протеолитической способностью, активны 76 с показателем достоверности $p < 0,05$.

Впервые в нашей работе применено определение железо-восстанавливающего потенциала, а именно на микробных объектах, которое основано на использовании индикаторной системы, содержащей ионы трехвалентного железа, которые в ходе окислительно-восстановительной реакции переходят в восстановленную форму железа, свидетельствуя об антиоксидантной активности исследуемого образца. Согласно данной методике, увеличение значений оптической плотности указывает на рост восстановительного потенциала биологического образца и на увеличение антиоксидантного эффекта.

Исследования проводили на 12, 14, 18, 24 и 48 ч. инкубации культур микроорганизмов.

У 14 штаммов активность увеличивается от 0 до 12 ч. культивирования, что составляет 16,6%. У 21 штамма (25%) активность проявляется от 12 до 14 ч. К их числу относятся изоляты, выделенные из грудного молока. В период от 12 до 18 ч. инкубации 22 штамма – 26,1% ($p < 0,05$) лактобактерий проявили активность. 19 изолятов были активными в период от 12 до 24 ч. и 8 – от 24 до 48 ч. культивирования; 22,6 ($p < 0,05$) и 9,5% соответственно. К этому временному периоду относятся штаммы, изолированные из различных молочных продуктов. Таким образом, выявлено, что наибольшая антиоксидантная активность наблюдается на период от 12-14 ч., 12-18 ч. и 12-24 ч., а наименьшая активность на 48 ч., что, возможно, связано с замедлением процессов роста и размножения микроорганизмов (рис. 3).

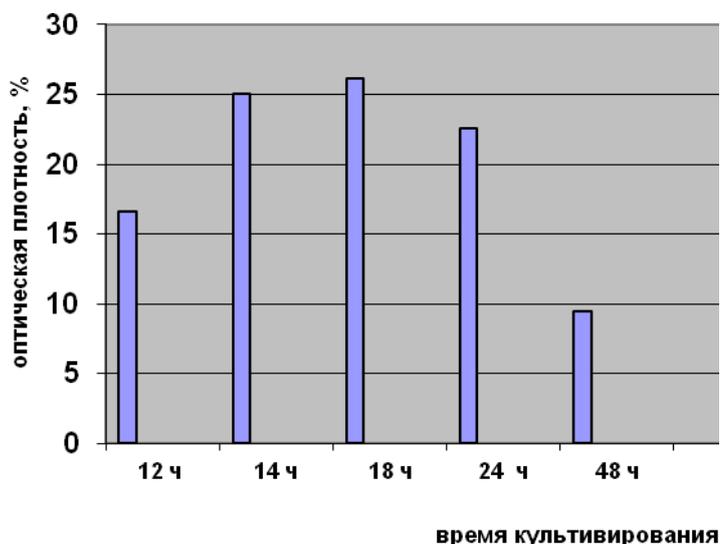


Рис. 3. Антиоксидантная активность исследуемых бактерий

В последующих исследованиях нами планируется проведение альтернативного изучения антиоксидантной активности по методике Kullsaar T. et al., которая основана на определении влияния экзогенных веществ на степень перекисного окисления органического субстрата – линоленовой кислоты [13].

ВЫВОДЫ

Таким образом, была проведена работа по созданию коллекции молочнокислых бактерий, выделенных из различных источников, изучены их пробиотические свойства. Определена способность штаммов ферментировать углеводы в микробиологических тестах. По результатам исследований были отобраны 31 активных штаммов, обладающих высоким пробиотическим потенциалом, они представлены такими видами как *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*.

Отобранные в результате скрининга культуры молочнокислых бактерий характеризуются высокой степенью антагонистической активности к ряду условно-патогенных микроорганизмов. Для них характерна устойчивость к таким антибиотикам как канамицин, ванкомицин, стрептомицин и тетрациклин. Характеризуются устойчивостью к секретам желудочно-кишечного тракта. Устойчивость к желчи характеризуется показателем жизнеспособности 10^5 - 10^6 КОЕ/мл, устойчивость к последовательному действию кислоты и желчи – 10^7 - 10^8 КОЕ/мл, устойчивость к солям – 10^7 - 10^8 КОЕ/мл. Также пробиотически активные культуры обладают протеолитической, антиоксидантной, лизоцимной и антилизоцимной активностью.

Полученные результаты экспериментов позволили отобрать активные штаммы в качестве стартерных культур для создания биопрепаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ускова М.А. Изучение свойств пробиотических молочнокислых бактерий как биологически активных компонентов пищи: автореф. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 28 с.
- 2 Краткий определитель Берги / под ред. Дж. Хоулта. – М.: Мир, 1980. – С. 287-294.
- 3 Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров Н.А. и др. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: Изограф, 2005. – С. 19-23.
- 4 Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования // под ред М.О. Бургер. – М.: Медицина, 1982. – С. 170-177.
- 5 Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – С. 62-63, 355.
- 6 Aswathar H.N. In vitro free radical scavenging potencial of methanol extract of entire plant of *Phyllanthus poir* // *Pharmacology on line*. – 2008. – Vol. 2. – P. 440-451.
- 7 Бисембаева С.К., Иманбаева М.И., Калина Н.В. и др. Методы определения патогенных свойств возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний: методические рекомендации / под ред. Ш.И.Сарбасовой. – Астана, 2000. – С. 15, 18.
- 8 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания: МУК 4.2.1890-04. – М., 2004. – 90 с.
- 9 Методические указания по изучению морфолого-физиологических свойств специфических возбудителей кумыса, изготовленного в разных регионах Республики Казахстан / под ред. Б.Т. Толысбаева. – Алматы, 2006. – С. 8-9.
- 10 Genci G., Trotta F., Galdini G. Устойчивость спор и вегетативных клеток *Bacillus clausii* к пробам, имитирующим транзит по желудочно-кишечному тракту // *Здоровье Украины*. – 2008. – №19/1. – С. 57-59.
- 11 El-Ghaish S., Dalgalarondo M., Choiset Y. et al. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity // *European Food Research and Technology*. – 2010. – Vol. 230. – P. 635-643.
- 12 Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67. – P. 5482-5487.
- 13 Kullissar T., Songisepp E. et al. Antioxidativ probiotic fermented goats milk decrease oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects // *Brit. J. Nutr.* – 2003. – Vol. 90 (2), P. 444-449.

ТҮЙІН

Түрлі экологиялық нысандардан бөлініп алынған 84 сүтқышқылды штамдардың биологиялық қасиеттерін зерттеу барысында алынған мәліметтер көрсетілген. Жинақталған коллекция лактобациллалардың 7 түрінен: *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueskii*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*, *Lb. brevis*, *Lb. casei* және лактококктардың 2 түрі: *L. lactis* және *L. piscium* тұрады. Штамдардың микробиологиялық тесттерде көмірсуларды ыдырату қасиеті анықталды. Алынған нәтижелер жоғары пробиотикалық потенциалға ие белсенді штамдарды іріктеуге мүмкіндік берді. Сүтқышқылды бактериялардың осы культуралары шартты-

патогенді микроорганизмдердің бірқатарына жоғары антагонистік белсенділікке ие. Оларға канамицин, ванкомицин, стрептомицин және тетрациклин сияқты антибиотиктерге тұрақтылық тән. Асқазан-ішек жолдарының секретіне тұрақтылықпен сипатталады. Өтке тұрақтылық 10^5 - 10^6 КТБ/мл, қышқыл мен өттің кезекті әсеріне тұрақтылық 10^7 - 10^8 КТБ/мл, тұздарға тұрақтылық - 10^7 - 10^8 КТБ/мл өмірсүргіштік көрсеткішімен сипатталады. Сонымен қатар пробиотикалық белсенді культуралар протеолитикалық, антиоксиданттық, лизоцимді және антилизозимді белсенділікке ие.

Тәжірибе нәтижесінде алынған мәліметтер биопрепарат құру барысында негізгі культуралар ретінде белсенді штамдарды бөліп алуға мүмкіндік берді.

Кілтті сөздер: лактобациллалар, пробиотиктер, антагонизм, антибиотикке тұрақтылық, пробиотикалық қасиеттер.

SUMMARY

The data of 84 lactic acid bacteria strains isolated from various ecological niches investigation were displayed. The assembled collection is represented by 7 species of lactobacilli: *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueskii*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*, *Lb. brevis*, *Lb. casei* and 2 lactococcus species: *L. lactis* and *L. piscium*.

The ability of strains to ferment carbohydrates in microbiological tests was determined. The results obtained allowed to select the active strains with high probiotic potential. These cultures of lactic acid bacteria are highly antagonistic active upon several opportunistic microorganisms. They are characterized by resistance to antibiotics such as kanamycin, vancomycin, streptomycin and tetracycline. They also characterized by resistance to the secrets of the gastro-intestinal tract. Resistance to bile was characterized by the vitality of 10^5 - 10^6 CFU/ml, the resistance to serial acid and bile action – 10^7 - 10^8 CFU/ml, salt tolerance - 10^7 - 10^8 CFU/ml. Also active probiotics cultures have proteolytic, antioxidant, and antilysozyme, lysozyme activity.

The obtained experimental data allowed to select the active strains as starter cultures for the creation of biological products.

Keywords: lactobacillus, probiotics, antagonism, resistance to antibiotics, probiotics properties.